

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/8062

JP 99/534

29.09.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 9月29日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第291505号

出 願 人
Applicant(s):

清水 元治

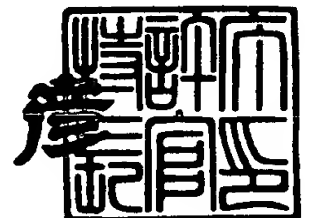
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3075831

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1314N2

【提出日】 平成10年 9月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 新規ポリペプチドをコードするDNA

【請求項の数】 18

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1

 【氏名】 清木 元治

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1

 【氏名又は名称】 清木 元治

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【代理人】

 【識別番号】 100096183

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチドをコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド

- (a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド
- (c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (d) (c)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテアーゼ活性を有するポリペプチド

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項4】 請求項2または3に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項6】 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、請求項5記載の形質転換体。

【請求項7】 Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 9】 請求項 2 または 3 記載の DNA の有する塩基配列中の連続した 5 ～ 60 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項 1 記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

【請求項 11】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項 1 記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【請求項 12】 請求項 1 記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。

【請求項 13】 請求項 1 記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 14】 請求項 2 または 3 記載の DNA を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 15】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 16】 請求項 2 または 3 の DNA、または請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚

血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害または白血球の浸潤に伴う炎症の治療のための遺伝子治療用ベクター。

【請求項 17】 請求項 1 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

【請求項 18】 遺伝子の発現を調節する化合物を、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を測定することにより検出することを特徴とする、請求項 17 記載のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ポリペプチドの製造方法に関する。更に、該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞を利用した阻害薬または活性化薬を探索する方法および該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、金属イオンを活性中心に持つマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下 MMPs と略記する）が関与している。

【0003】

これまで MMPs としては、間質型コラゲナーゼ（MMP-1）、ゼラチナーゼ A（MMP-2）、ゼラチナーゼ B（MMP-9）、ストロメライシン 1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラゲナーゼ（MMP-8）、ストロメライシン 2（MMP-10）、ストロメライシン 3（MMP-11）

)、メタロエラスターゼ(MMP-12)、コラゲナーゼ3(MMP-13)、膜貫通型MMP-1(MT1-MMPまたはMMP-14)、膜貫通型MMP-2(MT2-MMPまたはMMP-15)、膜貫通型MMP-3(MT3-MMPまたはMMP-16)、膜貫通型MMP-4(MT4-MMPまたはMMP-17)等が報告されている〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)〕。これらのMMPsはファミリーを形成し、各MMPは基本的にN-末端プロペプチドドメイン、亜鉛イオンが結合する活性ドメイン、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。膜貫通型では、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインのC-末端に膜貫通ドメインと、細胞内ドメインを持っている。ヒトMT4-MMP遺伝子は既に報告されているが〔Puente: Cancer Research, 56, 944 (1996)〕、該遺伝子の塩基配列には翻訳開始領域が含まれておらず、単にMMPに類似したドメイン領域を有する塩基配列を含んでいるとして定義された遺伝子である。従って、該遺伝子はMT4-MMP完全長をコードしているとは考えにくい。

【0004】

変形性関節症の患者においてMT1-MMPの産生が促進されていること〔Am. J. Pathol., 151, 245 (1997)〕、免疫や炎症反応に重要な白血球の組織への浸潤にMMPが重要なこと〔J. Immunol., 156, 1 (1996)〕、MMP阻害薬が肝炎を予防すること〔Eur. J. Pharmacol., 341, 105 (1998)〕、MMP阻害薬が角膜潰瘍の治療〔日本眼科学会誌, 102, 270 (1998)〕に有効であること等が知られている。

【0005】

また、癌の増殖、浸潤、転移にMMPが重要であることが知られており〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)〕、MMP阻害薬が制癌活性をもつことが報告されている〔SCRIP, 2349, 20 (1998)〕。

更に、MT4-MMPは白血球に発現して、白血球の遊走と浸潤に関係があることが示唆されている。

【0006】

以上のことから、MMPは変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫

疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症を診断する指標となるとともに、その阻害薬はこれらの疾患の予防と治療に用いることができる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

既に報告されているMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996)] は、転写開始点を含まず、従来知られているMT1-MMP等の膜貫通型MMPに見られるようなドメイン構造を持っていないため、生体内では発現していない非生理的なペプチドをコードした配列である。本発明は、従来報告されているMT4-MMPとは異なり、生理的に活性を持った新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド〔以下、MT4-MMP(2)と略すこともある〕、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、既知のヒトMT4-MMPは本来の活性を有する蛋白質ではなく、活性を有する真のMT4-MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下(1)～(18)に関する。

(1) 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

【0010】

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) (c) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

【0011】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラークローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコルズ1~38と略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0012】

(2) 上記(1)記載ポリペプチドをコードするDNA。

(3) 配列番号3の86~1846番または配列番号4の100~1917番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【0013】

上記において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列番号3の86~1846番または配列番号4の100~1917番に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーショ

ン法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0014】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラクローニング第2版、カレントプロトコルインモレキュラバイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0015】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号3の86～1846番または配列番号4の100～1917番に記載の塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0016】

(4) 上記(2)または(3)に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(5) 上記(4) 記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(6) 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、上記(5) 記載の形質転換体。

【0017】

(7) Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、請求項6 記載の形質転換体。

(8) 上記(1) に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリ

ペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0018】

(9) 上記(2)または(3)記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【0019】

(10) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

(11) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【0020】

(12) 上記(1)記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。

(13) 上記(1)記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【0021】

(14) 上記(2)または(3)記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【0022】

(15) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関

節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症の診断薬、治療薬または予防薬。

【0023】

(16) 上記(2)または(3)のDNA、または上記(9)記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症の治療のための遺伝子治療用ベクター。

【0024】

(17) 上記(1)記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、上記(1)記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

(18) 遺伝子の発現を調節する化合物を、上記(1)記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することにより検出することを特徴とする、上記(2)記載のスクリーニング法。

【0025】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 新規マトリックスメタロプロテアーゼMT4-MMP(2)をコードするDNAの取得

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

【0026】

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシ

アネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

【0027】

全RNAからポリ (A)⁺RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラークローニング第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法 [細胞光学 別冊8「新細胞光学実験プロトコール」秀潤社48-52頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61(1988)] 等を用いることができる。

【0028】

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

【0029】

適切な細胞または組織として、データベースから見出されたMT4-MMPをコードするDNAのEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

【0030】

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラークローニング第2版やカレントプロトコールズインモレキュラーバイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等を

あげることができる。

【0031】

cDNAライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda

ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplex (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

【0032】

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラークローニング第2版)等を用いることができる。

【0033】

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライ

ブラリーをあげることができる。

【0034】

(2) 本発明のDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラークロニング第2版〕等により選択することができる。

【0035】

プローブとしては、一部明らかになっているMT4-MMPをコードするDNAの塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

上記方法により得られた、目的とするクローンより、上述の方法でmRNAを取得し、cDNAを合成する。

【0036】

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)および3'-RACE〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕により、プライマーに用いた配列よりも5'端側および3'端側のcDNA断片を得ることができる。

【0037】

得られたcDNA断片をつなぎあわせることにより全長のcDNAを取得することができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいはパーキン・エルマー社(Perkin Elmer: 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア(LI-COR)社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0038】

本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子の塩基配列を決定するために

は、通常の染色体DNAクローン化法を用いることができる（モレキュラークローニング第2版）。

即ち、本発明のポリペプチドを発現している細胞、例えばモノサイト系のTHP-1細胞等、の染色体DNAを制限酵素で消化し、該切断断片を通常のプラスミドベクターまたはファージベクターを用いてクローニングし、ゲノムライブラリーを作製する。

【0039】

上記において取得され、塩基配列の決定されたDNA断片をプローブとして用い、上記のcDNAクローニングで用いた方法と同様の方法で該ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子を有するクローンを取得することができる。

【0040】

該クローンを用いて、上述の方法によりゲノム遺伝子の塩基配列を決定することができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

【0041】

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

【0042】

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ（FrameSearch）などの相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Protなどのアミノ酸配列データベースを検索するこ

とにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

【0043】

該方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号3または配列番号4で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpmMT4/pBSSKを、配列番号4で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT4/pBSIIKSをあげることができる。

【0044】

プラスミドpmMT4/pBSSKを含有する大腸菌Escherichia coli pmMT4/pBSSKは、FERM BP-6528として、プラスミドphMT4/pBSIIKSを含有する大腸菌Escherichia coli phMT4/pBSIIKSは、FERM BP-6530として平成10年9月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目3番（郵便番号305-0046）に寄託されている。

【0045】

（3）本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記記載のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0046】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号3または4で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度（ T_m ）および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0047】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3'-P 5'ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0048】

[2] 本発明のマトリックスメタロプロテアーゼMT4-MMP (2) ポリペプチドの調製 (1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させるためには、モレキュラークローニング第2版やカレント・プロトコルズ1〜38等に記載された方法を用いることができる。

【0049】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを作成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を

発現できるものであればいずれも用いることができる。

【0050】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0051】

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ(Promega)社製）、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pET-3（ノバジェン社製）等をあげることができる。

【0052】

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp×2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0053】

リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始

コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0054】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratiaficaria、Serratiafonticola、Serratialiquefaciens、Serratiam arcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0055】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法（特開昭63-2483942）、エレクトロポレーション法〔Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)〕等をあげることができる。

【0056】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを
用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター
、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック
ポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロ
モーターをあげることができる。

【0057】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベ
ロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピヒア等に属する酵母菌株
をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharo
myces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces
alluvius、Pichiapastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい
ずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enz
ymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. US
A, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0058】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE10
7 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平2-22707
5)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社
製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [Journal of Biochemistry, 10
1, 1307 (1987)] 等が用いられる。

【0059】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いる
ことができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate earl
y) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネ
インのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモー
ター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺
伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0060】

動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、HEK293細胞 (ATCC: CRL-1573)、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等をあげることができる。

【0061】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコルズ1~38、Bio Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0062】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

。

【0063】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0064】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

【0065】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラークローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0066】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、本発明のポリペプチドを発現する適切な発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

【0067】

（2）形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0068】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解

解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0069】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0070】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0071】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0072】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地

[Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0073】

培養は、通常 pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0074】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0075】

培養は、通常 pH 6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、Q-セファロース、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオ

ン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0076】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0077】

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞上に発現された場合には、培養細胞の膜画分を界面活性剤で溶解して可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0078】

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド

合成機を利用し化学合成することもできる。

【0079】

〔3〕本発明のポリペプチドの生物活性の検出

上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性は、ペプチドまたは蛋白質の分解物を電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを用いて測定するか、または蛍光標識あるいはアイソトープ標識したペプチドまたは蛋白質の分解で測定する。ペプチドが切断されることで活性化される酵素の活性化状態を測定することでも検出可能である。ゼラチンザイモグラフィーに用いられるのと同様に、該酵素によって分解されるペプチドを含むゲルを用いても測定できる。

【0080】

〔4〕本発明のポリペプチドの阻害薬または活性化薬の探索および同定

本発明のポリペプチドについて〔2〕記載の方法で本発明のポリペプチドを発現させた細胞、〔2〕記載の方法で調製した本発明のポリペプチド発現大腸菌から〔2〕に記載した方法で精製した本発明のポリペプチドに被験試料を添加する。

【0081】

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を比較することにより、被験試料の中からプロテアーゼ活性を増強する物質（活性化薬）および阻害する物質（阻害薬）をスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

【0082】

被験試料としてペプチドを用いる場合、ランダムペプチドライブラリーを利用することができる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプ

チドシステム (peptides on phage) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT特許出願番号96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム (peptides on plasmids) (米国出願特許番号5,270,170;米国出願特許番号5,338,665) があげられる。

また、本発明のMT4-MMP (2) に結合するペプチドは、ランダムペプチドライブラリーを利用してスクリーニングすることにより取得できる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプチドシステム (peptides on phage) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT特許出願番号96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム (peptides on plasmids) (米国出願特許番号5,270,170;米国出願特許番号5,338,665) があげられる。

[5] 本発明のDNA、ポリペプチドの利用

(1) 本発明のDNAは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から[1](2)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

【0083】

また、本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から[1](2)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことによってもmRNAの検出や定量を行うことができる。これらの該ポリペプチドmRNA定量法は本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。

【0084】

各種病態モデル動物における該ポリペプチドmRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該ポリペプチドmRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(2) 本発明のDNAあるいは該DNAの一部の塩基配列と同じ塩基配列または相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対してinsituハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)] を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

【0085】

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかという情報や、細胞がどのような刺激を受けたときに発現量に変化するかという情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するのに役立つ。

(3) 本発明のDNAをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション (モレキュラークロニング第2版) を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの疾患の診断を行うことができる。

【0086】

(4) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA/DNA)は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより [化学46, 681 (1991)、Bio Technology, 9, 358 (1992)]、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療あるいは予防などへの応用も期待される。

【0087】

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域にある10～50塩基と

相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、本発明のポリペプチドに代えて本発明のDNAを用いる以外は、下記に示した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様な方法を用いて調製または投与される。

【0088】

(5) 本発明のDNAを用い、[2]記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの診断薬、治療薬または予防薬が考えられる。

【0089】

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、診断薬または治療薬として該ポリペプチド単独で投与することも可能ではあるが、通常は該ポリペプチドを薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、貯蔵のため凍結乾燥し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0090】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は非経口経路、例えば皮下、筋肉内、静脈内、気道内等の投与経路が用いられる。

(6) 本発明のDNA（センスDNAまたはアンチセンスDNA）またはこれらの塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス等のウィルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることが

できる。

【0091】

【実施例】

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0092】

実施例1 マウスMT4-MMP関連蛋白〔MT4-MMP(2)〕遺伝子のクローニング MT4-MMP遺伝子はヒトの脳で高発現していることから、マウス17日胚の脳cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

【0093】

ヒトMT4-MMP遺伝子の部分配列((配列番号13の233-1899)をプローブとして用い、上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブランクハイブリダイゼーション法により行った。

該スクリーニングにより上記プローブとハイブリダイズする陽性クローンの数種について塩基配列を解析した。解析したクローンは全て報告されたヒトMT4-MMP遺伝子において欠落していると思われるシグナルペプチド配列部分を含んでおり、最長のクローンは3.5kbであった。従って、マウスでは587アミノ酸の配列番号1に記載したMT4-MMP(2)を発現できる配列番号3に記載したDNAに対応するmRNAが発現していると考えられた。

【0094】

実施例2 ヒトMT4-MMP(2)遺伝子のクローニング

ヒトMT4-MMP遺伝子に関するESTクローンをデータベースで調べたが、上記マウスで見られたようなシグナルペプチドをコードする部分を含むクローンの登録はなかった。従って、ヒトMT4-MMP遺伝子において分泌型のヒトMT4-MMP遺伝子は存在しないか、あるいは単離するには困難な理由があると思われた。

【0095】

上記で取得したマウスMT4-MMP(2)遺伝子のシグナルペプチドに相当

するN末の部分をコードする配列をプローブとしてヒト脳cDNAライブラリー（クロンテック社製）をスクリーニングしたが、相当する遺伝子の単離はできなかった。そこで5' RACE法にて転写産物の5'領域の解析を行った。細胞はMT4-MMP mRNAの発現が確認された単核球由来のTHP-1 (ATCC TIB-202, American Type Culture Collection) 細胞を用いた。

【0096】

即ち、ヒトTHP-1細胞から単離したpoly(A)+ RNAとヒトMT4-MMP (2) 選択的なプライマー（配列番号5）を使用して superscript II（ギブコBRL社製）でcDNAを作成した。得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター（配列番号6）をT4RNAリガーゼでつなぎ、MT4-MMP (2) 選択的なプライマー（配列番号5）とアダプター選択的なプライマー（配列番号7）でGC緩衝液とLA Taq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー（配列番号8）とアダプター選択的なプライマー（配列番号9）を用いてPCRを行った。

【0097】

50個のクローンを解析した結果、3個はMT4-MMPの配列を含むcDNA断片であったが、47個はマウスMT4-MMP (2) に類似するシグナルペプチド配列をコードするcDNA断片であった。このことにより、既に明らかになっているプロペプチド配列の下流部分に加えて、シグナルペプチドを含む配列番号2に示すヒトMT4-MMP (2) をコードする配列番号4に示すmRNAの全量域が明らかとなった。ESTクローンのH97792クローンの遺伝子配列はPuenteにより報告されたMT4-MMP [Cancer Research, 56, 944 (1996): 配列番号13] とほとんど同一であったが、触媒領域の配列の一部が異なっており、ESTクローンH97792の方がマウスMT4-MMP (2) との保存性が高かった。全配列を新たに決定したところ、Puenteにより報告されたMT4-MMPの既に明らかになっている部分においても、MT4-MMP (2) は配列の異なる部分が見られた。

【0098】

マウスおよびヒトMT4-MMP (2) は相互によく保存されており、プロペ

プチド、触媒、ヒンジ、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの各ドメインはそれぞれ87、87、78、96%のホモロジーを有していた。シグナルペプチドと膜貫通部位比較的類似性が低く54と35%であった。また、触媒ドメインのヒトMT4-MMP(2)とMT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMPの間との比較は、それぞれ、36、39、31%であった。このことから、マウスMT4-MMP(2)はヒトMT4-MMP(2)に最も近く、ヒトMT4-MMP(2)のマウスホモログであると結論された。

【0099】

実施例3 MT4-MMP(2)の発現と遺伝子産物の検出

単離したcDNAから確かに遺伝子産物が翻訳されることを確認するために、cDNAをSV40プロモーターを持つpSG5ベクター(ストラタジーン社製)に組み込んだ。発現した産物の検出のために、潜在型酵素のプロセッシング部位の下流にFLAG配列(イーストマンケミカル社製)を組み込むことにより、抗FLAG抗体による検出を可能とした。

【0100】

COS-1細胞にマウスおよびヒトのMT4-MMP(2)の発現プラスミドをトランスフェクションし、48時間後に採取した細胞を溶解して、ウエスタン法によってFLAG標識MT4-MMPの検出を行った。抗FLAG抗体M2(イーストマンケミカル社製)によってともに、発現プラスミドをトランスフェクションした細胞に特異的な66 kDaのバンドが検出された。

【0101】

実施例4 MT4-MMPの転写産物の検出および解析

MT4-MMP転写産物は5'端にAlu配列を持つことから、イントロンを含んでいる可能性があったため、ヒトMT4-MMP(2)遺伝子の部分配列(配列番号4の212~519番目)に示した部分をプローブとして用い、ヒューマンサイエンス研究資源バンクのライブラリー(Deposit No. LI020)よりハイブリダイゼーション法により、ハイブリダイズするクローンを単離して、該クローンよりプラスミドを常法により抽出し、該プラスミドに含有されるMT4-MMPの5'末端付近の塩基配列(配列番号13の140~272番)の周辺の遺伝子

配列を調べた。

【0102】

MT4-MMPとMT4-MMP (2) 遺伝子を比較した時に、相同性が無くなる領域のMT4-MMP遺伝子配列(配列番号13の1～139番)はゲノム配列(配列番号14の3008～3147番)にほぼ一致し、その境界にはスプライシングドナー配列が存在した。MT4-MMPのエクソンコードする配列(配列番号13の140～340番)はゲノムの配列(配列番号14の3148～3280番)と(配列番号14の3564～3633番)にほぼ一致した。以上の結果から、第一イントロンを残した転写産物がMT4-MMPであると結論された。

【0103】

以上の結果から、ヒトではMT4-MMPとMT4-MMP (2) の2種類のmRNAが発現していると考えられた。

これら2種類の転写産物をそれぞれRT-PCRによって識別するために、それぞれに特異的な5'領域のプライマー(MT4-MMP:配列番号10, MT4-MMP (2):配列番号11)と共通の3'プライマー(配列番号12)を作成した。

これら転写産物の各種癌細胞における発現を第1表に示した。

【0104】

【表1】

第1表 MT4-MMP(2) およびMT4-MMPの
転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT4-MMP(2)	MT4-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	++	+/-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	++	+	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	++	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	++	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	++	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	++	-	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	+/-	-	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	++	-	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	-	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	-	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	++	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	++	+/-	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	++	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	++	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	++	+	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	++	+	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	++	+	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	++	+	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+	-	ATCC CCL-121

++:強発現、+:中程度の発現、+/-:少量発現、-:発現無し

ATCC: American Type Culture Collection

HS財団: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研: 特殊法人理化学研究所

発酵研: 財団法人発酵研究所

【0105】

MT4-MMPはMT4-MMP(2)の発現が認められる細胞でだけ発現していた。

以上の結果から、MT4-MMP(2)が主たる転写産物であるが、細胞によっては類似した転写制御下にMT4-MMPの発現が起こっていると考えられる。

【0106】

実施例5 マウス組織におけるMT4-MMP(2)の発現

4週齢のマウスの組織を臓器ごとに切除してRNAを抽出してMT4-MMP(2)の発現パターンを調べた。20 μ gの全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写して³²Pで標識したマウスMT4-MMP(2)遺伝子をプローブに用いてノーザンプロットングを行い、MT4-MMP(2)の発現パターンを調べた。

【0107】

特に発現の高い臓器は脳、小脳、脳幹、大腸、子宮、睾丸であった。副腎、乳腺、胎盤ではほとんど発現は認められなかった。マウスでの発現結果はPuenteらによるヒト組織での報告[Cancer Research, 56, 944 (1996)]と一致した。

マウスの各臓器でのMT4-MMPの発現は脳で非常に高く、他に大腸、子宮、睾丸など限定された組織での発現が見られ、MT1-MMP, MT2-MMPが比較的広範な組織での発現を示すのに対して特徴的であった。このことから、MT4-MMP(2)が発現臓器に特異的な細胞外基質の分解を介して、組織の恒常性維持に関与していると考えられる。

【0108】

実施例6 マウスMT4-MMP(2)部分ペプチドの大腸菌での発現

配列番号1の321～550番目に示されるアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基の付加した配列を有するマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドを、マウスMT4-MMP(2)のcDNAを鋳型として用いPCR法で増幅した。

【0109】

得られた増幅断片を大腸菌の発現ベクターであるpET3a(宝酒造社製)にサブクローニングして、さらに大腸菌株BL21(DE3) pLysS(宝酒造社製)に導入した。

該大腸菌を100 μ g/mLのアンピシリン存在下、1Lの発現用培地でOD₆₀₀が0.5になるまで培養して、0.4mmol/Lのイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)で刺激後さらに3時間培養した。

【0110】

培養後、常法に基づいて大腸菌内に形成されたマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドよりなる顆粒(inclusion body)を取得し、8mmol/L尿素、50mmol/L Tris-HCl (pH 8.6) および20mmol/Lジチオスレイトールを含む可溶化液に溶解した。

【0111】

該溶解液をHigh Q anion exchange columnにアプライし、0.2mmol/L NaCl 溶出フラクションを回収した。

該フラクション中のマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドを常法通りにリフォーミングし、得られた溶液を50mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150mmol/L NaCl、10mmol/L CaCl₂ および0.02% NaN₃を含む緩衝液で平衡化したS-200カラムクロマトグラフィーに通塔し、ゲルろ過を行い、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインに相当するマウスMT4-MMP(2)部分ペプチドを取得した。

【0112】

【発明の効果】

本発明により得られる新規MT4-MMP(2)ポリペプチドのDNAを用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎または動脈硬化などの白血球の浸潤を伴う炎症、角膜潰瘍を含む創傷、白血病、癌などの疾患の診断、予防、治療が可能となる。

【0113】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Seiki Motoji

<120> DNA CODING FOR NOVEL POLYPEPTIDE

<130> H10-1314N2

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 587

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro

1 5 10 15

Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu

20 25 30

Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu

35 40 45

Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala

50 55 60

Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala

65 70 75 80

Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu

85

90

95

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro

100

105

110

Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro

115

120

125

Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe

130

135

140

Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr

145

150

155

160

Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Thr Pro Leu Asn Phe His Glu

165

170

175

Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp

180

185

190

His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His

195

200

205

Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp

210

215

220

Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp

225 230 235 240

Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser

245 250 255

His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro

260 265 270

Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg

275 280 285

Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln

290 295 300

Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro

305 310 315 320

Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln Lys Asp Val Pro His Arg Cys

325 330 335

Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe

340 345 350

Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val

355 360 365

Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu

370 375 380

His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys
385 390 395 400

Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn
405 410 415

Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro
420 425 430

Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr
435 440 445

Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg
450 455 460

Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro
465 470 475 480

Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe
485 490 495

Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala
500 505 510

Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly
515 520 525

Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg
530 535 540

Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala
545 550 555 560

His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp
565 570 575

Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys Ala Ser
580 585

<210> 2

<211> 606

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Arg Arg Ala Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro
1 5 10 15

Gly Leu Ser Arg Leu Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Ala Leu Gly Thr Arg Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg
35 40 45

Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr
50 55 60

Leu Pro Pro Ala Asp Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu

65	70	75	80
Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala			
	85	90	95
Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg			
	100	105	110
Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg			
	115	120	125
Gln Ala Pro Ala Pro Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg			
	130	135	140
Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg			
	145	150	155
Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu			
	165	170	175
Asn Phe His Glu Val Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe			
	180	185	190
Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly			
	195	200	205
Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Asp			
	210	215	220

Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala
225 230 235 240

His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala
245 250 255

Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr
260 265 270

Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu
275 280 285

Asp Lys Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser
290 295 300

Pro Thr Ala Gln Pro Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp
305 310 315 320

Asn Arg Ser Ser Ala Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser
325 330 335

Thr His Phe Asp Ala Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe
340 345 350

Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser
355 360 365

Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His
370 375 380

Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile

385 390 395 400

Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val

405 410 415

Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly

420 425 430

Gly Ile Asp Ala Ala Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe

435 440 445

Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met

450 455 460

Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser

465 470 475 480

Thr Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe

485 490 495

Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala

500 505 510

Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp

515 520 525

Ser Gln Ala Asp Gly Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly

530

535

540

Pro Arg Ala Pro Pro Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly

545

550

555

560

Tyr Glu Val Cys Ser Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala

565

570

575

Pro Gly Pro Leu Val Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu

580

585

590

Ser Pro Gly Ala Leu Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

595

600

605

<210> 3

<211> 3517

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(1846)

<400> 3

ggcacgaggg cgcgagccg agcgaggcgc ggagctggct gctggcgggt gcggggaccc 60

tcgccacccg acctgggaga gcggg atg gga cgc cgc ccg cgg gga cct ggg 112

Met Gly Arg Arg Pro Arg Gly Pro Gly

1

5

tcc ccc cgg gga cct ggc cct cca cgc ccc ggg ccg ggg ctg cca cca 160
 Ser Pro Arg Gly Pro Gly Pro Pro Arg Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro
 10 15 20 25

ctg ctg ctt gta ctg gcg ctg gcg gcc cat ggg ggc tgc gca gcg ccc 208
 Leu Leu Leu Val Leu Ala Leu Ala Ala His Gly Gly Cys Ala Ala Pro
 30 35 40

gcg ccc cgc gcg gag gac ctc agc ctc ggg gtg gag tgg cta agc agg 256
 Ala Pro Arg Ala Glu Asp Leu Ser Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg
 45 50 55

ttt ggc tac ctg ccg cct gca gat ccg gca tca ggg cag cta cag acc 304
 Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp Pro Ala Ser Gly Gln Leu Gln Thr
 60 65 70

cag gag gaa ctg tcc aaa gcg att act gcc atg cag cag ttt ggt ggt 352
 Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly
 75 80 85

ctg gag acc act ggc atc cta gat gag gcc act ctg gcc ctg atg aaa 400
 Leu Glu Thr Thr Gly Ile Leu Asp Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys
 90 95 100 105

acc cct cga tgc tcc ctt ccg gac ctg ccc cct ggg gcc caa tcg aga 448
 Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp Leu Pro Pro Gly Ala Gln Ser Arg
 110 115 120

agg aag cgg cag act cca ccc cca acc aaa tgg agc aag agg aac ctt 496

Arg Lys Arg Gln Thr Pro Pro Pro Thr Lys Trp Ser Lys Arg Asn Leu

125

130

135

tct tgg agg gtc cgg aca ttc cca cgg gac tca ccc ctg ggc cgg gat 544

Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro Arg Asp Ser Pro Leu Gly Arg Asp

140

145

150

act gtg cgt gca ctc atg tac tac gcc ctc aaa gtc tgg agt gac atc 592

Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile

155

160

165

aca ccc ttg aac ttc cac gag gta gcg ggc aac gcg gcg gac atc cag 640

Thr Pro Leu Asn Phe His Glu Val Ala Gly Asn Ala Ala Asp Ile Gln

170

175

180

185

atc gac ttc tcc aag gcc gac cac aat gac ggc tac ccc ttc gat ggc 688

Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly

190

195

200

cct ggt ggc acg gtg gcc cac gca ttc ttc cct ggt gac cac cac acg 736

Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala Phe Phe Pro Gly Asp His His Thr

205

210

215

gca ggg gac acc cac ttt gat gac gat gag cca tgg acc ttc cgt tcc 784

Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp Asp Glu Pro Trp Thr Phe Arg Ser

220

225

230

tca gat gcc cac ggg atg gac ctg ttt gca gtg gcc gtc cat gag ttt 832

Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe

235

240

245

ggt cat gcc att ggt ctg agc cat gtt gcc gcc cca agc tcc atc atg 880

Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His Val Ala Ala Pro Ser Ser Ile Met

250

255

260

265

caa ccg tac tac cag ggc ccc gtg ggt gac ccc gta cgc tat gga ctt 928

Gln Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val Gly Asp Pro Val Arg Tyr Gly Leu

270

275

280

ccc tat gag gac agg gtg cgt gtc tgg cag ttg tac ggt gtg cgg gaa 976

Pro Tyr Glu Asp Arg Val Arg Val Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu

285

290

295

tcc gtg tcc cct act gcc cag ctg gat acc cca gag ccc gag gag cca 1024

Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Leu Asp Thr Pro Glu Pro Glu Glu Pro

300

305

310

ccc ctc ctg cca gag ccc ccc aac aat cgg tct agc act ccg ccc cag 1072

Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asn Asn Arg Ser Ser Thr Pro Pro Gln

315

320

325

aag gac gtg cct cac agg tgc act gcc cac ttt gat gct gtg gcc cag 1120

Lys Asp Val Pro His Arg Cys Thr Ala His Phe Asp Ala Val Ala Gln

330

335

340

345

att cga ggc gaa gca ttc ttt ttc aaa ggc aag tat ttc tgg agg ctg 1168

Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe Trp Arg Leu

350	355	360	
acc cgg gac cga cac ttg gtg tgc ctg cag ccg gct caa atg cat cgc		1216	
Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln Met His Arg			
365	370	375	
ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agt gtg gac gcc gtg tat		1264	
Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp Ala Val Tyr			
380	385	390	
gag cgt acc agt gac cac aag att gtc ttc ttc aaa gga gac aga tac		1312	
Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly Asp Arg Tyr			
395	400	405	
tgg gtg ttt aag gac aac aac gta gag gaa ggg tac ccg cga cct gtc		1360	
Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro Arg Pro Val			
410	415	420	425
tcc gac ttc agc ctc ccg cca ggt ggc atc gat gct gtc ttc tcc tgg		1408	
Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Val Phe Ser Trp			
430	435	440	
gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg tac tgg cgc		1456	
Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu Tyr Trp Arg			
445	450	455	
tat gat gac cac aca cgg cgc atg gac cct ggc tac cct gcc cag gga		1504	
Tyr Asp Asp His Thr Arg Arg Met Asp Pro Gly Tyr Pro Ala Gln Gly			
460	465	470	

ccc ctg tgg aga ggt gtc ccc agc atg ttg gat gat gcc atg cgc tgg 1552
Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Met Leu Asp Asp Ala Met Arg Trp
475 480 485

tct gat ggt gca tcc tat ttc ttc cga ggc cag gag tac tgg aaa gtg 1600
Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr Trp Lys Val
490 495 500 505

ctg gat ggc gag ctg gaa gca gcc ccc ggg tac cca cag tct aca gcc 1648
Leu Asp Gly Glu Leu Glu Ala Ala Pro Gly Tyr Pro Gln Ser Thr Ala
510 515 520

cgc gac tgg ctg gta tgc ggt gag ccg ctg gcg gat gcg gag gat gta 1696
Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Glu Pro Leu Ala Asp Ala Glu Asp Val
525 530 535

ggg cct gga ccc cag ggc cgc agt ggg gcc caa gat ggt ctg gca gta 1744
Gly Pro Gly Pro Gln Gly Arg Ser Gly Ala Gln Asp Gly Leu Ala Val
540 545 550

tgt tcc tgc act tca gac gca cac agg ttg gca ctg cca tct ctg ctg 1792
Cys Ser Cys Thr Ser Asp Ala His Arg Leu Ala Leu Pro Ser Leu Leu
555 560 565

ctt ctg act cca ctg ctg tgg ggc ctg tgg acc tca gtc tct gcc aag 1840
Leu Leu Thr Pro Leu Leu Trp Gly Leu Trp Thr Ser Val Ser Ala Lys
570 575 580 585

gca tcc tgagggcagt gctagccttg cggatcaagg agccagggga gcagggacac 1896

Ala Ser

actggccagt actcagcagg acttgtgctc caagcttccg gtccctcgct ccttccttcc 1956

tctcttccct gaaccaggg gtgctgtgcc atctgctgga gtggtctcca gctgggacag 2016

gacgtccac caagggcatc catgcacacc ttgcctacct ggagcagcca taggcagctc 2076

cccttccctc cctgacacat cagctgctt cgttgacct tgccgggctg cccaagccca 2136

gctgtcaca cccagcatg ccttgtctgc acctgagcgg cctgatggc atctgcacgt 2196

gggtgatga ggggcaaaca ggggttctc gtggtatccg taggggccac catgcctgtt 2256

tcacaagtaa gagagttagt gccccgatgg gggaacaggg tgggagaaag gcacctaccc 2316

agaagtctga tccactgccg tttgcagcag ccagcgccgt atctgctggg ataggggacc 2376

agtcacactc aggatctgcc cacagattcc cagatgctgg caaggggcct tgcaccaact 2436

accaggagca cagccacctc tccccgtcct agataggtaa gccatggagg ctgtgtcctg 2496

ttatctccct ccttttgcc aggagagcat tgtgggtctc cctcggtgc tgtgatggg 2556

ggtggggggc gccatagag atatttctc atctgtcagt accattgct tcagcaagat 2616

gccccatat agttctggcc tgagaccctg cagcttgac tcacagctgt cccctcccca 2676

gctgcagaag ggcttctaac acctggaata aaggtgggcg ttcagtttag ggaaggagga 2736

tggttggggg agcccagggt gatagcaagg gggagctgca gggataagtg tcagggtcct 2796

cggggagtca tgacaatggt accgcctaac tiggagatgt aggagctgtg cacggattgc 2856

ttctctgggt gacaaacctc catggtccag aaaggggctg aggttgaacc caagatgggt 2916

taatgagctc cagaaaggaa cagccaagtt caaaggttct gggacaagac gggcctgagg 2976

aacagggccca cccaggtagg cgtggctgta gggtaagcag tttctgtcat tgggcacgag 3036

atgaaaatta gtgatcacac gcacataccc cctccccaa ctggcccgtt cccatctcag 3096

gtaagaaagg cttctgtcta ccccaggcca ggtttgagtg ttgtcaggat gagtgagcag 3156

ctagcggggc ctaagtttct accctccatt tccaagcct ggccacaccc tagaccctg 3216

tcagactagg caggacagag tcaggggtag gggcatctga ggtttccctg tcttgggaagc 3276

cacctactc tgccctcata tcaaagcacg ctctatgat gtccatgtt gtccaccagc 3336

ctgcaggaca cagatgtcct atacagcaac agggaaagtc caaaaatctt tgtcacatag 3396

cactgaaaac cagaccgcga ggctggagct gtctagatgc tgggtgcaca ctcatittaa 3456

aacccaaact ctttaataaaa atttgtaca ctggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3516

<210> 4

<211> 2423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(1917)

<400> 4

ccggcggggg cgccgcggag agcggagggc gccgggctgc ggaacgcgaa gcggagggcg 60

cgggaccctg cacgccgcc gcgggccc atg cgg cgc cgc gca 114

Met Arg Arg Arg Ala

1

5

gcc cgg gga ccc ggc ccg ccg ccc cca ggg ccc gga ctc tcg cgg ctg 162

Ala Arg Gly Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Pro Gly Leu Ser Arg Leu

10

15

20

ccg ctg ctg ccg ctg ccg ctg ctg ctg ctg gcg ctg ggg acc cgc 210

Pro Leu Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Thr Arg

25

30

35

ggg ggc tgc gcc gcg ccg gaa ccc gcg cgg cgc gcc gag gac ctc agc 258

Gly Gly Cys Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Asp Leu Ser

40

45

50

ctg gga gtg gag tgg cta agc agg ttc ggt tac ctg ccc ccg gct gac 306
 Leu Gly Val Glu Trp Leu Ser Arg Phe Gly Tyr Leu Pro Pro Ala Asp
 55 60 65

ccc aca aca ggg cag ctg cag acg caa gag gag ctg tct aag gcc atc 354
 Pro Thr Thr Gly Gln Leu Gln Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ala Ile
 70 75 80 85

aca gcc atg cag cag ttt ggt ggc ctg gag gcc acc ggc atc ctg gac 402
 Thr Ala Met Gln Gln Phe Gly Gly Leu Glu Ala Thr Gly Ile Leu Asp
 90 95 100

gag gcc acc ctg gcc ctg atg aaa acc cca cgc tgc tcc ctg cca gac 450
 Glu Ala Thr Leu Ala Leu Met Lys Thr Pro Arg Cys Ser Leu Pro Asp
 105 110 115

ctc cct gtc ctg acc cag gct cgc agg aga cgc cag gct cca gcc ccc 498
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Ala Arg Arg Arg Arg Gln Ala Pro Ala Pro
 120 125 130

acc aag tgg aac aag agg aac ctg tgc tgg agg gtc cgg acg ttc cca 546
 Thr Lys Trp Asn Lys Arg Asn Leu Ser Trp Arg Val Arg Thr Phe Pro
 135 140 145

cgg gac tca cca ctg ggg cac gac acg gtg cgt gca ctc atg tac tac 594
 Arg Asp Ser Pro Leu Gly His Asp Thr Val Arg Ala Leu Met Tyr Tyr
 150 155 160 165

gcc ctc aag gtc tgg agc gac att gcg ccc ctg aac ttc cac gag gtg 642
 Ala Leu Lys Val Trp Ser Asp Ile Ala Pro Leu Asn Phe His Glu Val
 170 175 180

gcg ggc agc acc gcc gac atc cag atc gac ttc tcc aag gcc gac cat 690
 Ala Gly Ser Thr Ala Asp Ile Gln Ile Asp Phe Ser Lys Ala Asp His
 185 190 195

aac gac ggc tac ccc ttc gac ggc ccc ggc ggc acc gtg gcc cac gcc 738
 Asn Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Gly Thr Val Ala His Ala
 200 205 210

ttc ttc ccc ggc cac cac cac acc gcc ggg gac acc cac ttt gac gat 786
 Phe Phe Pro Gly His His His Thr Ala Gly Asp Thr His Phe Asp Asp
 215 220 225

gac gag gcc tgg acc ttc cgc tcc tcg gat gcc cac ggg atg gac ctg 834
 Asp Glu Ala Trp Thr Phe Arg Ser Ser Asp Ala His Gly Met Asp Leu
 230 235 240 245

ttt gca gtg gct gtc cac gag ttt ggc cac gcc att ggg tta agc cat 882
 Phe Ala Val Ala Val His Glu Phe Gly His Ala Ile Gly Leu Ser His
 250 255 260

gtg gcc gct gca cac tcc atc atg cgg ccg tac tac cag ggc ccg gtg 930
 Val Ala Ala Ala His Ser Ile Met Arg Pro Tyr Tyr Gln Gly Pro Val
 265 270 275

ggt gac ccg ctg cgc tac ggg ctc ccc tac gag gac aag gtg cgc gtc 978

Gly Asp Pro Leu Arg Tyr Gly Leu Pro Tyr Glu Asp Lys Val Arg Val

280

285

290

tgg cag ctg tac ggt gtg cgg gag tct gtg tct ccc acg gcg cag ccc 1026

Trp Gln Leu Tyr Gly Val Arg Glu Ser Val Ser Pro Thr Ala Gln Pro

295

300

305

gag gag cct ccc ctg ctg ccg gag ccc cca gac aac cgg tcc agc gcc 1074

Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Glu Pro Pro Asp Asn Arg Ser Ser Ala

310

315

320

325

ccg ccc agg aag gac gtg ccc cac aga tgc agc act cac ttt gac gcg 1122

Pro Pro Arg Lys Asp Val Pro His Arg Cys Ser Thr His Phe Asp Ala

330

335

340

gtg gcc cag atc cgg ggt gaa gct ttc ttc ttc aaa ggc aag tac ttc 1170

Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ala Phe Phe Phe Lys Gly Lys Tyr Phe

345

350

355

tgg cgg ctg acg cgg gac cgg cac ctg gtg tcc ctg cag ccg gca cag 1218

Trp Arg Leu Thr Arg Asp Arg His Leu Val Ser Leu Gln Pro Ala Gln

360

365

370

atg cac cgc ttc tgg cgg ggc ctg ccg ctg cac ctg gac agc gtg gac 1266

Met His Arg Phe Trp Arg Gly Leu Pro Leu His Leu Asp Ser Val Asp

375

380

385

gcc gtg tac gag cgc acc agc gac cac aag atc gtc ttc ttt aaa gga 1314

Ala Val Tyr Glu Arg Thr Ser Asp His Lys Ile Val Phe Phe Lys Gly

390

395

400

405

gac agg tac tgg gtg ttc aag gac aat aac gta gag gaa gga tac ccg 1362

Asp Arg Tyr Trp Val Phe Lys Asp Asn Asn Val Glu Glu Gly Tyr Pro

410

415

420

cgc ccc gtc tcc gac ttc agc ctc ccg cct ggc ggc atc gac gct gcc 1410

Arg Pro Val Ser Asp Phe Ser Leu Pro Pro Gly Gly Ile Asp Ala Ala

425

430

435

ttc tcc tgg gcc cac aat gac agg act tat ttc ttt aag gac cag ctg 1458

Phe Ser Trp Ala His Asn Asp Arg Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Leu

440

445

450

tac tgg cgc tac gat gac cac acg agg cac atg gac ccc ggc tac ccc 1506

Tyr Trp Arg Tyr Asp Asp His Thr Arg His Met Asp Pro Gly Tyr Pro

455

460

465

gcc cag agc ccc ctg tgg agg ggt gtc ccc agc acg ctg gac gac gcc 1554

Ala Gln Ser Pro Leu Trp Arg Gly Val Pro Ser Thr Leu Asp Asp Ala

470

475

480

485

atg cgc tgg tcc gac ggt gcc tcc tac ttc ttc cgt ggc cag gag tac 1602

Met Arg Trp Ser Asp Gly Ala Ser Tyr Phe Phe Arg Gly Gln Glu Tyr

490

495

500

tgg aaa gtg ctg gat ggc gag ctg gag gtg gca ccc ggg tac cca cag 1650

Trp Lys Val Leu Asp Gly Glu Leu Glu Val Ala Pro Gly Tyr Pro Gln

505

510

515

tcc acg gcc cgg gac tgg ctg gtg tgt gga gac tca cag gcc gat gga 1698

Ser Thr Ala Arg Asp Trp Leu Val Cys Gly Asp Ser Gln Ala Asp Gly

520

525

530

tct gtg gct gcg ggc gtg gac gcg gca gag ggg ccc cgc gcc cct cca 1746

Ser Val Ala Ala Gly Val Asp Ala Ala Glu Gly Pro Arg Ala Pro Pro

535

540

545

gga caa cat gac cag agc cgc tcg gag gac ggt tac gag gtc tgc tca 1794

Gly Gln His Asp Gln Ser Arg Ser Glu Asp Gly Tyr Glu Val Cys Ser

550

555

560

565

tgc acc tct ggg gca tcc tct ccc ccg ggg gcc cca ggc cca ctg gtg 1842

Cys Thr Ser Gly Ala Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Val

570

575

580

gct gcc acc atg ctg ctg ctg ctg ccg cca ctg tca cca ggc gcc ctg 1890

Ala Ala Thr Met Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu

585

590

595

tgg aca gcg gcc cag gcc ctg acg cta tgacacacag cgcgagccca 1937

Trp Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr Leu

600

605

tgagaggaca gaggcggtgg gacagcctgg ccacagaggg caaggactgt gccggagtcc 1997

ctgggggagg tgctggcgcg ggatgaggac gggccaccct ggcaccggaa ggccagcaga 2057

gggcacggcc cgccagggtt gggcaggctc aggtggcaag gacggagctg tcccctagt 2117

agggactgtg ttgactgacg agccgagggg tggccgctcc agaagggtgc ccagtcaggc 2177

cgcaccgccg ccagcctcct ccggccctgg aggagcctc tcgggctggg ggcccacccc 2237

tctctgtgcc ggcgccacca accccaccca cactgtctgcc tgggtgctccc gccggccccc 2297

agggcctccg tccccaggtc cccagtgggg cagccctccc cacagacgag cccccacat 2357

ggtgccgcgg cacttcccc ctgtgacgcg ttccagacca acatgacctc tccctgcttt 2417

gtaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2438

<210> 5

<211> 21

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 5

GGTTCCTCTT GTTCCACTTG G

21

<210> 6

<211> 35

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtaggaattc gggttgtagg gaggtcgaca ttgcc

35

<210> 7

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggcaatgtcg acctccctac aac

23

<210> 8

<211> 22

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 8

ggagctgtct aaggccatca ca

22

<210> 9

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 9

ctccctacaa cccgaattcc tac

23

<210> 10

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 10

cttgtgggca gatagggggc

20

<210> 11

<211> 21

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 11

cgcgccgagg acctcagcct g

21

<210> 12

<211> 21

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 12

ggttcctctt gttccacttg g

21

<210> 13

<211> 2295

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aagagacaag aggtgccttg tgggcagata gggggctggg agggggcctg cccggaagca 60

gtgggtggccc gtggcaggct tctcactggg taggaccggg ccctctgttg caccacctca 120

ccctgctctc tgccttcagg agtggctaag caggttcggt tacctgcccc cggctgaccc 180

cacaacaggg cagctgcaga cgcaagagga gctgtctaag gccatcacag ccatgcagca 240

gtttggtggc ctggaggcca ccggcatcct ggacgaggcc accctggccc tgatgaaaac 300

cccacgtgc tccctgccag acctccctgt cctgaccag gctcgcagga gacgccaggc 360

tccagcccc accaagtga acaagaggaa cctgtcgtgg agggtcgga cgttcccacg 420

ggactcacca ctggggcacg acacggtgcg tgcactcatg tactacgcc tcaaggtctg 480

gagcgacatt gcgcccctga acttccacga ggtggcgggc agcaccgccg acatccagat 540

cgacttctcc aaggccgacc ataacgacgg ctaccccttc gacgcccggc ggcaccgtgc 600

ccacgccttc ttccccggcc accaccacac cgccgggtac acccacttta acgatgacga 660

ggcctggacc ttccgtcct cggatgccc cgggatggac ctgtttgcag tggctgtcca 720

cgagtttggc cagccattg ggttaagcca tgtggccgct gcacactcca tcatgcggcc 780

gtactaccag ggcccgggtg gtgaccgct gcgctacggg ctcccctacg aggacaaggt 840

gcgcgtctgg cagctgtac gtgtgcggga gtctgtgtct cccacggcgc agcccaggga 900

gcctcccctg ctgccggagc cccagacaa ccggtccagc gccccgcca ggaaggacgt 960

gccccacaga tgcagcactc actttgacgc ggtggcccag atccggggtg aagctttctt 1020
 cticcaaggc aagtacttct ggcggctgac gcgggaccgg cacctgggtg ccctgcagcc 1080
 ggcacagatg caccgcttct ggcggggcct gccgctgcac ctggacagcg tggacgccgt 1140
 gtacgagcgc accagcgacc acaagatcgt cttctttaaa ggagacaggt actgggtgtt 1200
 caaggacaat aacgtagagg aaggataccc gcgccccgtc tccgacttca gcctcccgcc 1260
 tggcggcatc gacgctgcct tctcctgggc ccacaatgac aggacttatt tctttaagga 1320
 ccagctgtac tggcgctacg atgaccacac gaggcacatg gaccccggct accccgcccc 1380
 gagccccctg tggaggggtg tccccagcac gctggacgac gccatgcgct ggtccgacgg 1440
 tgcctcctac ttcttccgtg gccaggagta ctggaagtg ctggatggcg agctggaggt 1500
 ggcacccggg taccacagt ccacggcccc ggactggctg gtgtgtggag actcacaggc 1560
 cgatggatct gtggctgcgg gcgtggacgc ggcagagggg ccccgcgccc ctccaggaca 1620
 acatgaccag agccgctcgg aggacggtta cgaggctgc tcatgcacct ctggggcatc 1680
 ctctcccccg ggggccccag gccactggt ggctgccacc atgctgctgc tgctgccgcc 1740
 actgtcacca ggcgcctgt ggacagcggc ccaggccctg acgctatgac acacagcgcg 1800
 agcccatgag aggacagagg cgggtgggaca gcctggccac agagggaag gactgtgccg 1860

gagtccttg gggaggtgct ggcgcgggat gaggacgggc caccctggca ccggaaggcc 1920
 agcagagggc acggcccgcc agggctgggc aggctcaggt ggcaaggacg gagctgtccc 1980
 ctagtgaggg actgtgtga ctgacgagcc gaggggtggc cgctccagaa gggtgcccag 2040
 tcaggccgca ccgccgccag cctcctccgg ccctggaggg agcatctcgg gctgggggcc 2100
 caccctctc tgtgccggcg ccaccaaccc caccacact gctgcctggt gctcccgccg 2160
 gccacaggg cctccgtccc cagggtccca gtggggcagc cctccccaca gacgagcccc 2220
 ccacatggtg ccgcggcacg tccccctgt gacgcgttcc agaccaacat gacctctccc 2280
 tgctttgtag cggcc 2295

<210> 14

<211> 4014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (3148)..(3280)

<220>

<221> exon

<222> (3564)..(3633)

<400> 14

tictgttggg gtgtccctgg caaactagga agtggttccc accctctcac tccagccccc 60

aagacggccc ctcccaggat gcctagcctg agatttgggg cacarcccct gagcacaaac 120

tcgtgttagg taggaggcac ccaccagccc tgccccacag acccaccacc cccaagatt 180

cgatgccatt ctatgctcaa attccagtgc ctcttggggc cacaggcgac agtgcctgtt 240

tatcatgggc ggggctgcct gtcccgggct ggtgccgggg ccttggttct atgagttgaa 300

gcaggctggc cgctcacacc tgcaactaaa ccacctgctt ccaaacattg ggcaacattc 360

cacagccact gggagtgcct cctgccaggc ccggctccac tttcctgaaa tgcatgtggc 420

ctcgtggcca ggctgcccag ctccctgggg accagagtgg ggggtgcccc aaaccgccac 480

cgtgaacccc acagagtaaa tgggccactc agtgcagcta ccagccatga cctcagctta 540

tagacgggaa ggctgggggg tgagttgtcc tccaagggg tctcagcacc tgctggccca 600

accaggcag cagctggcct ggggtgggaaa ggcacctgcc tgtgtggacc cttccctggt 660

gagggggcag ggggtcatca tccaatatca tagatgatgt gaggaaactc cagagtgtt 720

cctggaggag gtgacaggct attgtaacca tgaggcacag tggccctgtt gagctgtgat 780

cttaacaaag gactaaaaag tgcagaatgt gctgatgggc atctccagca cctacagcgg 840

tgactgatca tgggacaccc tcagtaaacc ctgcaggtgc aaggtagtgt gggaccgat 900
 gctcggggcc aaagatcccc acaccctgga ggtcagggcg gaagtgggag gccagcttgt 960
 caaggccaag gctgtcaccc ccaaggcccc tccagagaag ctgcccaccc cagtcatgaa 1020
 cgtccacttt gacgtcctgt cgtgcctata gctttggagg ggcccccagt tctgtacaca 1080
 ctcttggctt cccaagggg ctgaggggct gggctgggtc agtagggttt ggaaaggggg 1140
 taaaggcaca gagggggggc ccgggaagga ctcagtgtt cctggaagg gaatctcggg 1200
 gtgtgcagat cccatgtagt gtcttgtgag gcccctcctg gccagcacgs cctgttgtctg 1260
 atggccctgg gacttccagg atggtgggtc ctcatccct ctgagcactg cctgtctgkt 1320
 gggcaggagg gttggccagg accaccccat caccagctcc tgcagaccag aacctggagg 1380
 cccagcaggt ggcataawtg agtcacaagc attttctttt ttctttttcc tttttttttt 1440
 tttaggattt ctttaaaaag ttatgttttt ttcatttatg cattttttta ggtaagcca 1500
 catgaaacta ctagtattta ttttaaatca gaaatggta aaaatgggca ctttcatatg 1560
 atttgccaa tgaatacatg agaggtggta aataatagcg attcacaagc attttctaaa 1620
 tgtccaggga aaaaaaaaaag acaggtttgc aggcagggca gagccccag cacatcaccc 1680

ctggcttgta cttttctgga gccgcctca cccctgctgt ggttccctgg gctggcgagt 1740

atccacaggg cagagcagca gttcatggc agcctgcaag tgggcacagg cgccatttgg 1800

cggttgaaga aactgaagct aggggtggag gtagcccca cagatggcac ccaggcctgc 1860

catccccagg tccccacgat ggcaccagg tccccacaga tggcatccag gccccctgt 1920

ccccagggcc cctccagggt agcagagatg actggggcat ggggccaggg ctigatttat 1980

gcccaggta aagggtgcc ctcatcctg ctctactca gctccggtgt gggtagcctt 2040

gcaccacccc cagtgggccc ttcagagcag agctgtcccc tgcgccagggt gctgggtga 2100

acattttcca cgtcctggct cagtcctca tcaccagcct gccaggact ctgaggaagg 2160

agcccagagg ggtggactgc ctigccccag gcacacagcg gggagggtggc tgagtgggat 2220

ttgaacctag gcagcctggc tggaacctgg cttttgttc tgagacaggg tctcgctctg 2280

ttgcagacac agtctgcaac tctgtgctc aaacgatcct cccgcctcag cctcccaaag 2340

tgctgggatc tcaggcataa gccacagcac cggccaagcc tgggctctta tctcccccatt 2400

gaatgtacag catggcccaa ttccttaaag tgggtgtctga gccacagcct ttctcagctg 2460

gggtcccaga ccttggatgc tagacttccc tgtcacaagt cagctgagag cctgcatttg 2520

acactggcca catttaagag ctttttgaag gtcccttagc attttgcggt ctccaggaggc 2580

gtgggtggg gcaggttgc catgagtgtggt tgtacaggtc gtgcacggca caagctcaca 2640

ccatctaagg gacatcagat ttattttatt attcattttt tagatggagt ctgtctctgt 2700

cgcccaggct ggagtgcagt ggcacgatct cggctcactg caagctccgc ctcttggtt 2760

cccaccatic tctgcytca gcctcccgag tagctgggac tacaggcacc tgccaccaca 2820

cccggctaatt tttttgtatt ttttagtagag acggggtttc accatattag ctaggatggt 2880

ctccatctcc tgacctcatg atccgcctgc ctccgctcc caaactgctg ggattacagg 2940

cgtgagccac agcaccggc caggacatc aggtttatta agacactttt ccggcagctg 3000

cccagggaag agacagagag gtgccttgtg ggcagatagg gggctgggag ggggcctgcc 3060

cggaagcagt gttggcccgt ggcaggcttc tcttggtta ggaccgggccc ctctgttgca 3120

ccccctcacc ctgtctctg ccctcaggag tggctaagca ggttcggtta cctgcccccg 3180

gbtgacccca caacaggga gctgcagacg caagaggagc tgtctaaggc catcacagcc 3240

atgcagcagt ttkgtggcct ggaggchacc ggcattcttg gtcagttctc cagggggcag 3300

cgggagcgcc gtgsccttcg tcaggtctgc gcccgctggc catgccccct ctgatcaggc 3360

acagtcccg cttatgcttg aatgaacctg ggtcctggcc tgggttagct cagagcctgg 3420

ggctgggtccc ccaaagatga cgtgggagga gggsgcggct cggaggctgg tgccagagtc 3480

aggctcccg ccttggggat gctcgggata ctagggtggg gagtgagctg ggctaggctc 3540

tgagctccat gctttccctg cagacgaggc caccttggcc ctgatgaaaa cccacgctg 3600

ctccctgcc gacctcccct gtcctgacm caggtctcgc agggagacgc acaggtctcm 3660

cagccccmm mcaagtggac acagagagga acctgtcgtg gaggtgggtg cgtggccagg 3720

gtgaggagcg gggcctccgt ggaggtggsc gcgtggccag ggtgaggaaac ggggtctccg 3780

tggaggtggg cgcgtggcca ggggtgggaa cggggtctcc gtggaggcgg gtgcgtggcc 3840

agggtgagga acagggctct cgtggaggtg ggcgcgtggc cagggtgagg aacggggtct 3900

ccgtggaggc ggggtcgtgg ccagggtag gagtggggcc cccatgtctc cgtgtctggg 3960

cctgctgtag atatcaagct tatcgatacc gtcgacctcg agggggghcc gtac 4014

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドの提供。

【解決手段】 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) (c)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテアーゼ活性を有するポリペプチド

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 598133126
 【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1
 【氏名又は名称】 清水 元治

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビ
 ル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【代理人】 申請人

【識別番号】 100096183
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビ
 ル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 石井 貞次

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598133126]

1. 変更年月日 1998年 9月29日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都港区白金台4-6-1
氏 名 清木 元治
2. 変更年月日 1998年12月24日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都品川区小山台2-5, 5-203
氏 名 清木 元治